

## 1. ALAPKUTATÁS

A szepszis felelős az intenzív osztályokon történő halálozás legnagyobb részéért, a betegség mortalitása akár 50% is lehet. A szisztémás tüneteket a Gram negatív baktériumokból származó endotoxin (LPS) okozza. A halálozásban fontos szerepet játszik a szepszis hipodinám szakaszában bekövetkező kardiodepresszió, amiért szintén az LPS tehető felelőssé. A folyamat pontos mechanizmusa azonban még nem ismert. Az utóbbi évek szakirodalmában időnként felmerül, hogy a szisztolés bal kamra funkció romlásáért az LPS indukálta szívizomsejt apoptózis okolható, de ezt eddig még nem sikerült bizonyítani.

Az jól ismert, hogy az LPS a Toll-like-receptor4-en keresztül – a NF- $\kappa$ B közvetítésével – fokozza az indukálható nitrogén oxid szintetáz (iNOS) expresszióját és így a nitrogén oxid (NO) termelődését.

Munkatervünkben azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy megvizsgáljuk, vajon az általunk összeállított in vitro szepszis modellben is fokozza-e az apoptotikus sejtpusztulás arányát az LPS és ha igen, akkor a folyamat milyen intracelluláris jelátviteli utakon keresztül megy végbe. Az NO szerepét is tisztázni terveztük.

- *Beállítottuk az in vitro szepszis modellt:*

Újszülött patkányból primer szívizomsejt kultúrát készítettünk és a sejteket 60 mm-es sejtenyésző tálcában inkubátorba helyeztük. A negyedik napon borjú szérumot nem tartalmazó médiumot helyeztünk a sejtekre és a vizsgálatokat a hatodik napon kezdtük el. Ekkorra a sejtek kb. 300/perces frekvenciával szinkronban kontraháltak. A sejtkultúrákat emelkedő koncentrációjú endotoxinnal (0.05-10  $\mu$ g/ml) kezeltük 5 órán keresztül, majd elvégeztük a vizsgálatokat.

- *Megvizsgáltuk, hogy az LPS indukálja-e az újszülött patkány szívizomsejtek TNF-alfa termelődését.*

Jól ismert, hogy az LPS a TNF-alfa expresszióját jelentősen fokozza. Azt szintén tudjuk, hogy a TNF-alfa hatásos apoptózis induktor felnőtt patkány szívizom sejtekben illetve más sejtípusokban. A korábbi vizsgálataink újszülött patkány szívizomsejtekkel ezt soha nem erősítették meg.

A szívizomsejtek LPS kezelése után elvégeztük a médium TNF-alfa ELISA vizsgálatát. Már 0.025  $\mu$ g/ml LPS is 25-szörösére emelte a médium TNF-alfa koncentrációját, 1  $\mu$ g/ml LPS pedig 45-szörös TNF-alfa koncentráció emelkedést okozott.

- *Megvizsgáltuk a NF- $\kappa$ B szerepét a folyamatban*

Más sejtípusokon elvégzett vizsgálatok eredményeiből tudjuk, hogy az LPS a Toll-like-receptor4-en keresztül, a NF- $\kappa$ B közvetítésével fokozza a TNF-alfa és az iNOS expressziót, de szívizomsejteken ezt még nem igazolta senki.

Gel shift mobility assay segítségével igazoltuk, hogy az LPS-sel kezelt szívizomsejtekben a NF- $\kappa$ B sokkal nagyobb arányban kötődik az iNOS és TNF-alfa gének promoterén levő kötési helyéhez, mint a nem kezelt szívizomsejtekben.

- *Megvizsgáltuk, hogy az LPS indukálja-e az újszülött patkány szívizomsejtek apoptosist:*

Az endotoxinnal (0.05-10  $\mu$ g/ml) öt órán át kezelt szívizomsejteken „DNS létra minta” (DNA laddering) kimutatást végeztünk. Aktivált caspase-3 immunhisztokémiai festést végeztünk, és igazoltuk a caspase-3 aktivítás jelentős fokozódását az LPS-sel kezelt szívizomsejtekben. Ezután vizsgáltuk egy caspase-3 szubsztrát, a DNS repair-ért felelős poliADP ribóz-polimeráz (pARP) hasadását egyszerű Western blot módszerrel. A vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy 1  $\mu$ g/ml koncentráció felett az LPS apoptosist indukált. A szabadgyök fogó N-acetil cisztein (NAC) gátolta az apoptosist, ami bizonyítja, hogy a folyamat szabadgyök függő. A caspase inhibitor zVAD szintén gátolta az apoptotikus sejtpusztulást, ami a folyamat caspase függő mivoltára irányította rá a figyelmünket. A szívizomsejtek előkezelése az iNOS inhibitor LNMAA-val hatásosan gátolta az apoptosist, ami egyértelműen bizonyítja, hogy az LPS indukálta programozott sejthalál az NO közvetítésével alakul ki.

A TNF-alfát neutralizáló antitest (R&D Systems, Minneapolis, MN) nem befolyásolta az apoptotikus sejtpusztulást. Ezzel az eredménnyel újra megerősítettük azt a korábbi megfigyelésünket, hogy a TNF-alfa nem indukál apoptosist az újszülött patkány szívizomsejtekben.

A fenti eredményeket morfológiai módszerekkel is megerősítettük Hoechst festés után.

- *Megvizsgáltuk, hogy az LPS fokozza-e az újszülött patkány szívizomsejtek iNOS expresszióját és az NO metabolitok termelődését:*

Az endotoxinnal kezelt szívizomsejteken Northern blot analízist végezve sikerült kimutatnunk, hogy az iNOS expresszió jelentősen fokozódik. Az NO metabolitokat a Griess reagens (2.9 mmol/l szulfanilsav és 0.2

mmol/l N-{1-naftil} etiléndiamin-HCl 5%-os foszforsavban) segítségével mutattuk ki spektrofotométerrel (570 nm). A vizsgálat bizonyította, hogy 0.1 ug/ml LPS koncentrációtól felfelé meredeken emelkedett az NO metabolitok koncentrációja a médiumban. A TNF-alfát neutralizáló antitest nem befolyásolta az NO metabolitok termelődését.

- *Megvizsgáltuk, vajon az LPS az intrinsic vagy az extrinsic apoptosis utat aktiválja-e a szívizomsejtekben*  
Újszülött patkány szívizomsejteket kezeltünk 5 ug/ml endotoxinnal (10 perc – 8 óra). Ezután a sejteken elvégeztük az in vivo caspase-8 és caspase-9 assay-t (R&D Systems, Minneapolis, MN). A caspase-8 assay nem mutatott aktivitásfokozódást, ezzel igazoltuk, hogy az LPS nem az extrinsic úton keresztül aktiválja az újszülött patkány szívizomsejtek apoptózisát. Ezt bizonyítja az az eredményünk is, hogy a TNF-alfa neutralizálása nem befolyásolja az LPS által indukált apoptózis folyamatát.  
Ezzel párhuzamosan sikerült kimutatnunk a caspase-9 jelentős aktivitásfokozódását LPS-indukálta újszülött patkány szívizomsejt apoptózis során, ami igazolta az intrinsic apoptózis út szerepét.
- *Megvizsgáltuk, vajon az LPS fokozza-e a mitokondriumokból a citokrom c kiáramlást*  
Újszülött patkány szívizomsejteket kezeltünk 5 ug/ml endotoxinnal (10 perc – 8 óra). Ezután elkülönítettük a citoszolt a mitokondriumoktól és megvizsgáltuk, vajon van-e kimutatható mennyiségű citokrom c a citoszolban, ami szintén szükséges az intrinsic apoptózis út aktiválódásához és az apoptosome létrejöttéhez. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az LPS jelentősen fokozza a citokrom c citoszolba áramlását újszülött patkány szívizomsejtekben.
- *Megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe a c-jun N-terminális kináznak (JNK) az LPS által indukált apoptózis létrehozásában újszülött patkány szívizomsejtekben.*  
Az endotoxinnal kezelt szívizomsejtekben elvégezve az in vitro JNK aktivitás kimutatást kiderült, hogy az alacsony endotoxin koncentrációk (0.025-0.1 ug/ml) jelentősen fokozzák a JNK aktivitást, a magas endotoxin koncentrációk (1-10 ug/ml) viszont nem. Azaz alacsony endotoxin koncentrációk esetében magas a JNK aktivitás és nincs apoptózis, ezzel szemben magas endotoxin koncentrációnál alacsony a JNK aktivitás és nincs apoptózis. Ezek a vizsgálatok megerősíteni látszanak azt a korábbi megfigyelésünket (Andrika et al, Circulation Research 2001; 88: 305-312), hogy a JNK fokozott aktivitásának védő szerepe van az LPS indukálta szívizomsejt apoptózisban is.  
A fenti felvetésünk bizonyítására domináns negatív JNK-ot expresszáló adenovírussal fertőzött szívizomsejteket kezeltünk endotoxinnal (0.025-10 ug/ml) és ezután elvégeztük a DNS létraminta kimutatást. A vizsgálataink azt bizonyították, hogy az endogén JNK aktivitás gátlásával (a domináns negatív JNK mutánsal) az apoptotikus sejtpusztulás jóval nagyobb arányban következett be.  
Ezek az eredmények megerősítették, hogy az endotoxin által indukált fokozott JNK aktivitásnak védő szerepe van az endotoxin által indukált szívizomsejt apoptózisban.  
Ezután azt vizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli utakon keresztül fejt ki a JNK ezt a védő szerepét.  
A fenti kérdés megválaszolására domináns negatív JNK-ot expresszáló adenovírussal fertőzött szívizomsejteket kezeltünk endotoxinnal (0.025-10 ug/ml), és ezután elvégeztük a citokrom c kimutatást valamint a caspase-9 assay-t. Azt tapasztaltuk, hogy a domináns negatív JNK fertőzés nem befolyásolta a citokrom c kiáramlást. Ezzel szemben a domináns negatív JNK fertőzés többszörösére növelte a caspase-9 aktivitást, ami egyértelműen igazolja a JNK caspase-9 aktivitást csökkentő szerepét.  
Ezek az eredmények igazolták, hogy a JNK a caspase-9 aktivitásának csökkentésén keresztül fejt ki citoprotektív szerepét LPS által indukált szívizomsejt apoptózisban.

## 2. ALKALMAZOTT ALAPKUTATÁS

### **Autológ csontvelői őssejt transzplantáció szívizom infarktusbán**

Az elzáródott koronária artéria azonnali megnyitása akut szívizom infarktusbán jelentősen csökkentette a betegség korai halálozását és nagymértékben javította a betegek későbbi életkilátásait is. A véráramlás helyreállítása ellenére azonban a postinfarktusos szívelégtelenség továbbra is komoly klinikai probléma maradt azokban az esetekben, ahol a szívizom infarktus fellépte és az érintett koszorúér megnyitása között viszonylag hosszú idő telt el. Az ischaemiás eredetű szívelégtelenségért a kamrai remodeling folyamata a felelős, amit a bal kamra teljes szerkezeti átalakulása, az infarktusos terület expanziója és az üreg dilatációja jellemez. A bal kamrai remodeling visszafordítása a szívizomsejtek regenerációs képességének felgyorsításával és az infarktusos terület neovaszkularizációjának elősegítésével lenne megoldható. Néhány

szívizomsejt képes ugyan replikációra, de ezek száma elhanyagolható és a folyamat csak az életképes szívizomban mehet végbe, így a heg területét nem érinti. Ezért a mai modern kardiológia általánosan elfogadott álláspontja szerint a felnőtt szívizomsejtek nem képesek a miokardiumot regenerálni, mert számottevő proliferációjuk csupán a születés időpontjáig tart. A neuroendokrin rendszer aktivitását csökkentő szerek javítják ugyan a betegek túlélési esélyeit, de nem pótolják az élő, összehúzódásra képes szívizomsejteket. A nem gyógyszeres kezelési eljárások fejlesztése a mechanikus rásegítő eszközöktől a mesterséges szívig ígéretesnek mutatkozik, de még nagyon mesze vagyunk a megoldástól. A ma ismert egyetlen definitív kezelési eljárás, a szívtranszplantáció, is csak korlátozottan járulhat hozzá a mortalitáscsökkenéshez a donorszervek hiánya és az immunszuppresszió szövődményei miatt.

Az új terápiás stratégiák közül a szívizominfarktusból elvégzett sejtátültetés óriási gyakorlati lehetőséget hordoz magában. Azok az állatkísérletek, amelyekben izomsejtek transzplantációjával (embrionális szívizomsejtek, szkeletális mioblasztok) kísérelték meg helyettesíteni a nekrotikus területet, sikerrel jártak ugyan a szívizom pótlásában, de az új sejtek nem voltak képesek felvenni a szívizomsejtekre jellemző elektrofiziológiai tulajdonságokat, így aritmia szubsztrátumként működtek. Erre az eredményre jutott néhány klinikai vizsgálat is, ahol a malignus kamrai ritmuszavarok kivédésére – néhány betegnél - ICD beültetés vált szükségessé. Az utóbbi időben a kutatók figyelme ezért az őssejt transzplantációra, és a csontvelőre, mint őssejtforrásra irányult. Ezek az őssejtek megőrizték képességüket a korlátlan proliferációra, és különféle sejtekké képesek fejlődni, beleértve a szívizomsejteket is. A csontvelő, szemben az embrionális őssejtekkel, felnőtté válva kinyerhető, és nem állít fel etikai problémákat. Ezen felül ha a betegek saját őssejtjeit használjuk, azaz autológ őssejt transzplantációt végzünk, akkor a szöveti kompatibilitás és a rejekció sem jelent gondot. Négy évvel ezelőtt jelent meg Piero Anversa munkacsoportjának közleménye a Nature-ben, amiben arról számoltak be, hogy egerekben sikeresen pótolták az elpusztult szívizomsejteket autológ csontvelői őssejtek transzplantációjával. Kilenc nappal a transzplantáció után szívizomsejtek valamint endothelsejtek jellegzetességeit hordozó szövet foglalta el a károsodott terület nagy részét. Azóta több munkacsoportnak is sikerült igazolni az első eredményeket, és bizonyították, hogy az infarktusos területbe transzplantált autológ csontvelői őssejtek – a környezet hatására – szabályos szívizomsejtekké és endothelsejtekké differenciálódtak.

Az állatkísérletek után hamarosan napvilágot láttak az első klinikai vizsgálatok eredményei is. Itt egyértelműen az Európai Unió országai állnak az élen, messze megelőzve az Egyesült Államokat. A legtöbb klinikai tapasztalat az akut miokardiális infarktusból elvégzett perkután koronária intervenció után intrakoronáriásan végrehajtott autológ csontvelői őssejt transzplantációval gyűlt össze. A klinikai vizsgálatok mindegyike a szisztolés bal kamra funkció egyértelmű javulásáról számolt be, és igazolták a módszer biztonságosságát is. Egyik vizsgálati központ sem számolt be nem kívánatos vagy súlyos, nem kívánatos esemény előfordulásáról. A három nagyobb és több kisebb vizsgálat meggyőző eredményei hozzájárultak ahhoz, hogy az akut szívizom infarktus után elvégzett autológ csontvelői őssejt transzplantáció – szisztolés bal kamra funkcióra kifejtett – jótékony hatását az Európai Unió területén ma már kevesen kérdőjelezzik meg. Természetesen a módszer bevezetése óta eltelt rövid idő még nem tette lehetővé a nagy esetszámú mortalitási vizsgálatok elvégzését, ezek most vannak folyamatban. Ezen kívül számos kérdésre kell még választ kapnunk. Pontosan mi történik a beültetett csontvelői őssejtekkel és milyen sejtípusokká képesek differenciálódni? Milyen mechanizmussal javul a szív szisztolés funkciója? Hogyan történik a folyamat szabályozása? A transzplantáció után hogyan viselkednek majd a sejtek? Keletkezhetnek-e belőlük olyan sejtípusok is, amik a szív működést ronthatják: pl. fibroblasztok vagy tumorsejtek? Mennyi sejtet kell transzplantálni?

Jelen munkánkban ezen kérdések megválaszolására törekedtünk. A vizsgálatok elvégzéséhez egy in vivo disznó modellt választottunk. Ez utóbbi alkalmas az emberi szívinfarktus perkután koronária intervencióval történő kezelésének és a csontvelői őssejt transzplantációnak a modellezésére. Ezen kívül elindítottunk egy humán vizsgálatot is, aminek a módszer magyarországi bevezetése volt a legfőbb célja.

Annak ellenére, hogy már számos európai kardiológiai centrumban végeznek őssejttranszplantációt, a mai napig nem tudjuk pontosan megmondani, hogy mi az oka az őssejtek jótékony hatásának nagy kiterjedésű szívizom infarktusból. A probléma vizsgálatára kidolgoztunk egy nagyállat modellt, ami kiválóan alkalmas az emberi szívinfarktus, a primer perkután koronária intervenció valamint az infarktusból elvégzett csontvelői őssejt transzplantáció modellezésére. Kb. 25-30 kg-os disznókon végezzük el a kísérleteket. Intratrachealis narkózisban az arteria femoralist kivevük megkötézzük az állatok ramus descendens anterior (RDA) koronária ágát egy 7Fr-es jobb Judkins guiding katéterrel. Az ér ábrázolása után 14X3-3.5 mm-es PTCA ballont vezetünk az RDA proximális és középső részének határára, és 90 perces felfújással

nagy kiterjedésű szívizom infarktust hozunk létre. A szívizom infarktus létrejöttét az anteroseptális, esetleg extenzív anterior elvezetésekben kialakult ST elevációval, minimum három egymáshoz tartozó szegmentumban az echokardiográfiás szegmentális falmozgászavar kialakulásával és később a troponinT pozitivitással igazoljuk. Ezek után az állatokon kontrasztanyag MRI vizsgálatot végzünk a pontos bal kamrai dimenziók, a szisztolés és diasztolés bal kamra funkció, a szegmentális falmozgászavar valamint az infarktusos heg méretének meghatározására. A szívizom életképességét a late enhancement jelenség alapján értékeljük (1. ábra). A vizsgálatokat a Kaposvári Egyetem Radiológiai Diagnosztikai Centrumában végezzük. A technikát már sikeresen elsajátítottuk, a szívizom infarktust biztonságosan, reprodukálhatóan létre tudjuk hozni úgy, hogy az állatok életben maradnak. Eddig 10 disznón végeztük el a beavatkozást, ezek az állatok lesznek a kontroll állatok az összejt transzplantációs kísérletekhez, ahol GFP-vel jelölt mesenchymalis őssejtekkel tervezzük elvégezni a transzplantációt, hogy később az őssejtek szövettani módszerekkel is nyomon követhetők legyenek.

### **Távírányított ischaemiás poszt kondicionálás szívizom infarktusbán**

Az ischaemiás szívbetegség és következményei a halálozás vezető okainak számítanak a nyugati államokban, és nagyon megterhelik az egészségügyi ellátást. A miokardiális infarktus prognózisa jelentősen javult a „nyitott koszorúsér” fogalmának bevetése és a modern gyógyszeres kezelés elindítása óta, de ennek ellenére még mindig a szívelégtelenség és a halálozás vezető oka a fejlett országokban.

Az infarktus kiterjedése jelentősen befolyásolja a betegek rövid és hosszú távú túlélését. A jelenlegi kezelési stratégia középpontjában az infarktus következtében elhalt szívizom kiterjedésének csökkentése áll a lehető leggyorsabban elvégzett reperfúziós kezeléssel. Annak ellenére, hogy miokardiális infarktusbán egyértelműen bizonyított a reperfúziós kezelés mortalitást csökkentő hatása, mégis számolni kell a reperfúziós károsodással is, mint az endothel károsodás okozta no reflow jelenség, a miokardiális nekrosis és apoptózis.

Murrey és mtsai mutatták ki először kutyákon, hogy rövid ideig tartó ischaemiás epizódok paradox módon csökkentik egy későbbi miokardiális infarktus kiterjedését. Ezt a jelenséget, ami során a miokardium rövid ideig tartó ischaemiás inzultusra adaptációs és protektív válasszal reagál, „ischaemiás prekondicionálásnak” nevezzük. Az ischaemiás prekondicionálás létezését humán in vitro és in vivo vizsgálatokban is kimutatták.

A lokális hatások mellett az ischaemiát követő reperfúzió egy szisztémás gyulladásos válaszreakciót indít el, ami gyulladásos mediátorok termelődését indítja el és neutrophil aktivációt eredményez. Az ischaemiás prekondicionálással foglalkozó korai vizsgálatok inkább a lokális, egy szervre összpontosított előnyökre koncentráltak, annak ellenére, hogy a lokális ischaemiás prekondicionálás szisztémás hatására már felfigyeltek. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy nem létfontosságú, könnyen hozzáférhető szöveteken elvégzett ischaemia-reperfúzió megvédheti az ischaemia-reperfúzió áteső távolabbi vitális szerveket. Így elképzelhető lenne a létfontosságú szerveken elvégzendő direkt prekondicionálás kockázata. Gho és mtsai patkányokon azt figyelték meg, hogy előzetes mesenterialis vagy renalis artériás okklúzió és reperfúzió a később bekövetkező miokardiális infarktus kiterjedését csökkenti. Az alsó végtag ischaemiás prekondicionálása sertésekben is csökkenti az akut pulmonalis károsodást és a miokardiális infarktus méretét. Az első humán vizsgálatban Kharbanda és mtsai bebizonyították, hogy a távírányított prekondicionálás embereken is kiváltható. A felső végtag ischaemiás prekondicionálása egészséges önkéntesekben a neutrophil aktiváció és az endothel diszfunkció csökkenését okozta.

A prekondicionáló stimulus időzítése meghatározó tényező, és a folyamat bizonyítottan hasznos, azokban az esetekben, ahol az ischaemia kezdete ismert vagy megjósolható, mint a kardiopulmonalis bypass és a szerv transzplantáció. Azonban az ischaemiás prekondicionálás, legyen az direkt vagy távírányított, klinikai használatosságát komolyan korlátozza, hogy az ischaemiás esemény előtt kell alkalmazni, ami az akut miokardiális infarktus esetén kivitelezhetetlen, hiszen a kezdete megjósolhatatlan.

Korábban Vinten-Johansen és mtsai. leírtak egy folyamatot, amit poszt kondicionálásnak neveztek el. Amíg a prekondicionálás triggere egy rövid ideig tartó ischaemia-reperfúziós sorozat közvetlenül a hosszas koronária elzáródás előtt, addig a poszt kondicionálás egy rövid ideig tartó ischaemia-reperfúziós sorozat közvetlenül a hosszas ischaemiás inzultus után. Az utóbbi időben bizonyítást nyert, hogy az ischaemiás poszt kondicionálás ugyan olyan hatásos védelmet jelent a szívizomsejtek ischaemia-reperfúziós károsodásával szemben, mint a prekondicionálás. Az ischaemiás poszt kondicionálás indukál több, a sejtek túléléseért felelős jelátviteli utat, mint a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K)-Akt és a MEK ½-ERK jelátviteli utak különböző mediátorokon keresztül, mint pl. az endotheliális nitrogén-oxid. Ezeknek a jelátviteli utaknak a gátlásával az ischaemiás poszt kondicionálás protektív hatása blokkolható.

Számtalan állatkísérlet után az ischaemiás poszt kondicionálás első humán vizsgálatát 2005. októberben publikálták. A vizsgálatba 30, ST elevációs szívizom infarktuson (STEMI) átesett és primer perkután koronária intervencióra (PCI) felvett beteget randomizáltak, 15 beteg került az ischaemiás poszt kondicionálásos csoportba és 15 beteg a kontroll csoportba. A direkt stenteléssel elvégzett reperfúzió után a kontroll csoportnál nem történt más intervenció, a poszt kondicionált csoportnál viszont a reperfúzió kezdete után 1 percen belül elkezdve négy rövid ischaemia-reperfúzió történt 1 perces ballon felfújással (ischaemia), amit 1 perces ballon leengedés követett (reperfúzió). Az infarktus méretét a kreatinin foszfokináz enzim kiáramlásával határozták meg a felvételtől számított 72 órán keresztül, ami az infarktus méretének 36%-os csökkenését igazolta a poszt kondicionált csoportban a kontroll csoporttal összehasonlítva. A szívizom kontrasztanyag okozta elsötétedési szintje (blush grade), mint a reperfúzió markere, szignifikánsan nagyobb volt a poszt kondicionált csoportban, mint a kontroll csoportban. A vizsgálat eredménye alapján egyértelműen megfogalmazható, hogy primer PCI közben az elzárt koronária megnyitása után közvetlenül elvégzett ischaemiás poszt kondicionálás védi a szívet STEMI-ben, és egy könnyen kivitelezhető, biztonságos és eredményes cardioprotectiv beavatkozásnak tekinthető.

A Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézetben 2006. májusában kezdtük el vizsgálni disznókon a direkt és távirányított ischaemiás poszt kondicionálás hatásait. Tudásunk szerint ma Magyarországon munkacsoportunk foglalkozik egyedül az ischaemiás poszt kondicionálás témakörével, és a nemzetközi kardiológiai szakirodalomban mi írtuk le elsőként a távirányított ischaemiás poszt kondicionálás infarktus méretet csökkentő szerepét. A vizsgálatokat a Kaposvári Egyetem Egészségtudományi Kar Diagnosztikai Intézetében végeztük. Eredményeink jelenleg közlés alatt állnak a Cardiovascular Research című folyóiratban.

A vizsgálathoz 24 db, 18-22 kg-os Yorkshire sertést használtunk. Az állatokat véletlenszerűen poszt kondicionált és kontroll csoportra osztottuk. Általános anesztéziában a jobb arteria femoralison át egy JR3.5 guiding katétert helyeztünk a főtrzsbe, elvégeztük a coronarographiát, majd a guiding katéteren keresztül vezetődrótot vittünk a bal coronaria ramus interventricularis paraconalis (RIP) ágába. Az akut miokardiális infarktust a vezetődrót mentén a RIP-be vezetett és ott 6 atm-val 90 percig felfújva tartott PTCA ballonnal (2.5X10 mm Maverick) hoztuk létre a 2. diagonális ág után. A teljes RIP occlusiót kontrasztanyag befecskendezésével ellenőriztük. A miokardiális infarktus létrejöttét az ST eleváció kialakulásával, a kreatinin-foszfokináz (CPK) enzim kiáramlásával, gadolinium kontrasztanyag MR vizsgálattal és szövettani vizsgálattal igazoltuk.

A PTCA ballon leeresztése után azonnal reverzibilis alsó végtagi ischaemiát idéztünk elő a szisztolés vérnyomás fölé pumpált vérnyomásmérő mandzsettával 5 percig, amit a mandzsetta leeresztésével 5 perces reperfúzió követett. Az 5 perces ischaemiát követő 5 perces reperfúziót 4 ciklusban végeztük el.

Vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy sertésekben a RIP reverzibilis elzárásával létrehozott szívizom infarktusból a coronaria megnyitása után közvetlenül elvégzett távirányított poszt kondicionálás a nem létfontosságú alsó végtagon elvégzett reverzibilis ischaemia-reperfúziós ciklusokkal szignifikáns mértékben csökkentette a miokardiális infarktus kiterjedését a kontroll állatokhoz képest:

- 1, Az első 72 órában 15 alkalommal meghatározott szérum kreatinin-foszfokináz érték ábrázolásával elkészített grafikon alatti terület szignifikánsan kisebb volt a csoportban az infarktusos terület 26%-os csökkenését reprezentálta.
- 2, A gadolinium kontraszt MR a late enhancement jelenségét vizsgálva ugyancsak az infarktusos terület 22%-os csökkenését igazolta.
- 3, A szövettani vizsgálat szintén az infarktusos terület szignifikáns csökkenését igazolta a poszt kondicionált csoportban a kontroll csoporthoz képest.

Eredményeink elsőként igazolták az irodalomban azt a feltevést, hogy a könnyen elérhető, nem létfontosságú végtagizomzat rövid, reverzibilis ischaemia-reperfúziója távirányítással poszt kondicionálja a szívet az infarktus során elzárt coronaria megnyitása után közvetlenül végrehajtva. Ezzel az eljárással az infarktusos terület szignifikáns mértékben csökkenthető.

### 3. HUMÁN VIZSGÁLATOK

A disznóvizsgálatok során kidolgoztuk az intrakoronáriás autológ csontvelői őssejt transzplantáció technikai részleteit, és felkészültünk a beavatkozás humán alkalmazására.

Az országban elsőként indítottuk el az autológ csontvelői őssejt transzplantációt emberi szívizom infarktusbán. Az etikai bizottságtól (ETT-TUKÉB) 20 csontvelői őssejt transzplantációra és 20 kontroll beteg nyílt beválogatására kaptunk engedélyt. A munkaterv szerint az akut szívizom infarktussal (12 órán, perzisztáló mellkasi fájdalom esetén 24 órán belül) beérkezett betegek először - a szakmai ajánlásoknak megfelelően - primer perkután koronária intervención esnek át, amikor megnyitjuk az elzáródott koszorúeret. Az infarktuson átesett betegek közül 20 olyan beteget választunk be a csontvelő transzplantációs csoportba, akiknek nagy kiterjedésű (legalább három echokardiográfiás szegmentumot érintő), már a szisztolés bal kamra funkció romlásával is járó (ejekciós frakció < 50%) szívizom infarktusa van. A beválogatott betegeknél kontrasztanyagot végzünk a bal kamrai szisztolés és diasztolés funkció, a pontos bal kamrai dimenziók valamint az infarktus pontos kiterjedésének meghatározására. A szívizom életképességét a late enhancement jelenség alapján értékeljük. A csontvelőt az infarktus utáni 4-6. napon vesszük le, majd mononukleáris sejt szeparációt végzünk és a sejteket 10 ml-es végvolumenben koncentrálnak. Az összecsapzódás – és így a koronária embolizáció – megakadályozására DNázt adunk a sejtekhez. Ezek után meghatározzuk a CD34 és CD133 pozitív sejtek számát, valamint elvégezzük a sterilizációs próbákat. Még a csontvelő levételének napján megtörténik a transzplantáció az infarktust okozó koszorúér ismételt megkötözésével. A PTCA ballon felfújásával elzárjuk az áramlást, és a katéter centrális nyílásán keresztül beadjuk az őssejteket az érbe. A beavatkozás után a betegeket szorosan ellenőrizzük és a transzplantáció utáni hatodik hónap végén ismételt elvégezzük az MRI vizsgálatot.

Eddig 11 beteget transzplantáltunk, ami komoly következmények levonására semmiképpen sem elegendő. Az azonban eddig már biztos, hogy a beavatkozásnak rövid távú szövődménye nem alakult ki, biztonsággal elvégezhető.

A távirányított ischaemiás poszt-kondicionálást vizsgáló humán klinikai vizsgálat etikai engedélyeztetése folyamatban van.